

Presencia del receptor lactosilceramida (CD17) en células inflamatorias que rodean al grano en micetomas causados por *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*

Presence of the lactosilceramida receptor (CD17) in inflammatory cells surrounding the grain in mycetomas caused by Madurella mycetomatis, Nocardia brasiliensis and Actinomadura madurae.

Alejandro Palma-Ramos,¹ Araceli Monroy-Núñez,¹ Laura E Castrillón-Rivera,¹ Jorge Ismael Castañeda-Sánchez,¹ Elisa Vega-Memije,² Roberto Arenas-Guzmán³

Resumen

ANTECEDENTES: El micetoma es un síndrome de tipo inflamatorio crónico que depende de la inoculación traumática exógena de hongos verdaderos o de actinomicetos. La lactosilceramida (CD17) es un receptor celular que se encuentra en macrófagos, granulocitos, células T y células dendríticas, una vez activado induce adhesión celular a bacterias y hongos con función en la fagocitosis, atrapamiento, motilidad y la proliferación celular.

OBJETIVO: Demostrar la presencia *in situ* del receptor lactosilceramida en las células inflamatorias que rodean al grano en micetomas humanos, producidos por *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*.

MATERIALES Y MÉTODOS: Estudio prospectivo, efectuado de octubre de 2019 a febrero de 2020. Se utilizaron nueve estudios histopatológicos de pacientes con diagnóstico de micetoma por *M. mycetomatis*, *N. brasiliensis* y *A. madurae*, atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González (Ciudad de México). Se efectuaron dos cortes por muestra: uno para la realización de la tinción con hematoxilina y eosina, el otro para el marcaje de lactosilceramida con IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo.

RESULTADOS: Se observó mayor número de células CD17+ en los cortes de micetoma por *A. madurae*, seguido con menor cantidad en los ocasionados por *N. brasiliensis* y por *M. mycetomatis* que mostraron la misma cantidad.

CONCLUSIONES: Se encontraron células CD17+ en todos los micetomas estudiados, que pueden participar activamente en la respuesta inflamatoria que ocurre en este síndrome.

PALABRAS CLAVE: Micetoma; *Madurella mycetomatis*; *Nocardia brasiliensis*; *Actinomadura madurae*; lactosilceramida.

Abstract

BACKGROUND: Mycetoma is a chronic inflammatory syndrome acquired after exogenous traumatic inoculation of fungi or actinomycetes. Lactosylceramide (CD17) is a cellular receptor found in macrophages, granulocytes, T cells, and dendritic cells, once

¹ Laboratorio de Inmunobiología, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México.

² Departamento de Dermatología.

³ Sección de Micología.

Hospital General Manuel Gea González, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

Recibido: diciembre 2020

Aceptado: enero 2021

Correspondencia

Alejandro Palma Ramos
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Este artículo debe citarse como:

Palma-Ramos A, Monroy-Núñez A, Castrillón-Rivera LE, Castañeda-Sánchez JI, et al. Presencia del receptor lactosilceramida (CD17) en células inflamatorias que rodean al grano en micetomas causados por *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*. Dermatol Rev Mex 2021; 65 (3): 319-325. <https://doi.org/10.24245/dermatol-revmex.v65i3.5767>

activated, it induces cell adhesion to bacteria and fungi with a function in phagocytosis, entrapment, motility, and cell proliferation.

OBJECTIVE: To demonstrate the in situ presence of the lactosylceramide receptor in the inflammatory cells that surround the grain in human mycetomas, produced by *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* and *Actinomyces madurae*.

MATERIALS AND METHODS: Prospective study carried out from October 2019 to February 2020. Nine histopathological studies of patients diagnosed with mycetoma by *M. mycetomatis*, *N. brasiliensis* and *A. madurae* at the Dr. Manuel Gea González General Hospital (Mexico City). We performed two sections per sample: one for staining with hematoxylin and eosin, another for labeling lactosylceramide with anti-human CD17 IgM, and as secondary antibody IgG anti-IgM mouse FITC made in rabbit.

RESULTS: A high number of CD17+ cells were observed in the mycetoma sections caused by *A. madurae*, followed with lower number in those caused by *N. brasiliensis* and *M. mycetomatis*, which showed the same frequency.

CONCLUSIONS: CD17+ cells were found in all mycetomas studied, which can actively participate in the inflammatory response present in this syndrome.

KEYWORDS: Mycetoma; *Madurella mycetomatis*; *Nocardia brasiliensis*; *Actinomyces madurae*; lactosylceramide.

ANTECEDENTES

El micetoma es un síndrome de tipo inflamatorio crónico que depende de la inoculación traumática exógena de hongos verdaderos (eumicetoma) o de actinomicetos (actinomicetoma) que se organizan en agregados de hifas o filamentos bacterianos, respectivamente.^{1,2} Estas infecciones afectan la piel, el tejido celular subcutáneo y, en ocasiones, los músculos y los huesos. En México la frecuencia es de 73 casos por año, predomina en las zonas centro, norte y noroeste. Se considera la frecuencia de casos del 98% por actinomicetos y sólo el 2% son causados por eumicetos.³ *Nocardia brasiliensis* es la bacteria más frecuente, se observa en 65.5% de los casos, seguida de *Actinomyces madurae* con 7.9%;⁴ en el caso de los eumicetomas *Madurella* spp es el género predominante.⁵ En el tejido los granos están rodeados por una reacción inflamatoria de predominio de neutrófilos, en ocasiones se observa reacción granulomatosa con células epi-

telioides, células plasmáticas, linfocitos y células gigantes en proporciones variables.⁶

En los hongos filamentosos y las levaduras se encuentran los β -glucanos que son un grupo de polímeros de glucosa constituidos por unidades de β -(1-3)-D-glucopiranosil con cadenas laterales unidas en posición β -(1-6).^{7,8} Estas estructuras se consideran patrones moleculares asociados con patógenos (PAMPs),⁹ el reconocimiento de estas estructuras ocurre a través de receptores celulares específicos, como la lactosilceramida (CD17), receptores del complemento (CR 3), receptores scavengers y dectina-1, en donde este último media una serie de respuestas, como la fagocitosis, endocitosis y también en colaboración con los TLRs (receptores tipo Toll) pueden inducir la producción de citocinas inflamatorias y quimiocinas.¹⁰ La lactosilceramida es un glicoesfingolípido encontrado en muchos tipos celulares y consiste en un lípido hidrofóbico (ceramida) y un azúcar hidrofílico que forma

microdominios en la membrana. La interacción de este receptor aumenta el estallido oxidativo e induce la activación del NF- κ B aumentando la producción de proteínas inflamatorias en macrófagos del epitelio alveolar.^{11,12,13}

El objetivo de este trabajo es demostrar la presencia *in situ* del receptor lactosilceramida (CD17+) en las células inflamatorias que rodean al grano en cortes de micetomas humanos, producidos por *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio prospectivo en el que se utilizaron nueve bloques de parafina con tejido de pacientes con diagnóstico de micetoma, por *Madurella mycetomatis* (una muestra), *Nocardia brasiliensis* (seis muestras) y *Actinomadura madurae* (dos muestras), atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González. Este estudio se realizó de noviembre de 2019 a febrero de 2020, en el laboratorio de Inmunobiología de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. Se realizaron dos cortes por muestra: uno para la realización de la tinción con hematoxilina y eosina (H y E), otro para el marcaje de lactosilceramida con IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo.

Técnica histológica

Desparafinar: xilol 10 minutos, xilol-álcohol absoluto 5 minutos, alcohol absoluto 5 minutos, alcohol 96% 5 minutos, alcohol 70% 5 minutos, agua destilada 5 minutos.

Técnica para la tinción con hematoxilina-eosina (HE)¹⁴

Con el tejido ya desparafinado, colorear con hematoxilina de Harris durante un minuto y

lavar; posteriormente, diferenciar con alcohol-ácido, lavar y virar con agua amoniacal; luego, lavar nuevamente, colorear con eosina durante 30 segundos, deshidratar y montar.

Inmunohistoquímica, marcaje con fluorescencia¹⁵

Agregar PBS (7.4) 5 minutos, bloquear con PBS-gelatina (0.025%) 5 minutos, colocar el anticuerpo monoclonal IgM anti-CD17 humano hecho en ratón por Santa Cruz Biotechnology diluido 1/100 y, como anticuerpo secundario, IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo (abcam, ab8517) diluido 1/100 en solución de fosfato-gelatina (PBS-G). Incubar durante dos horas a temperatura ambiente en cámara húmeda y en la oscuridad. Lavar con PBS. Colocar una gota de glicerol-PBS (9:1). Observar en el microscopio de fluorescencia. Los resultados se analizarán de forma semicuantitativa, para determinar las células positivas para el anticuerpo anti-CD17, se contabilizará por milímetro cuadrado el número de células CD17+, localizadas alrededor del grano, y se determinará como leve (+) de una a dos células, moderado (++) de tres a cuatro células, o intenso (+++) de cinco células en adelante.

RESULTADOS

Se estudiaron 9 muestras de pacientes con diagnóstico de micetoma por *Madurella mycetomatis* (una muestra), *Nocardia brasiliensis* (seis muestras) y *Actinomadura madurae* (dos muestras), atendidos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

En la **Figura 1** se observan las microfotografías de las muestras de pacientes con micetomas característicos de cada agente causal (*Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura madurae*) en donde se observa el grano típico y la reacción inflamatoria que los rodea, teñidos por la técnica de HE. En el caso de *Madu-*

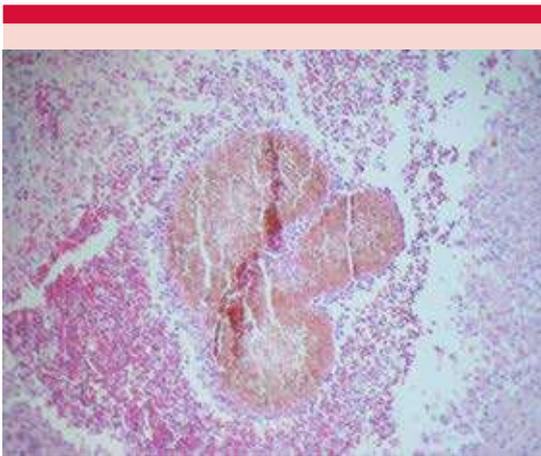


Figura 1. Micetoma humano por *Madurella mycetomatis* teñido por la técnica hematoxilina-eosina (H-E) observado a 40x.

rella mycetomatis se observan granos marrón con vesículas en su interior y pigmentación marginal de color oscuro. En el caso de *Nocardia brasiliensis* se observan granos pequeños arriñonados o vermiformes (**Figura 2**), *Actinomadura madurae* mostró granos con afinidad a la hematoxilina con contorno cartográfico. **Figura 3**

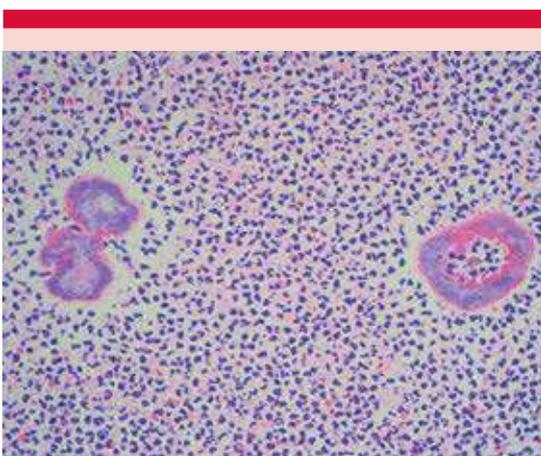


Figura 2. Micetoma humano por *Nocardia brasiliensis* teñido por la técnica hematoxilina-eosina (H-E) observado a 40x.

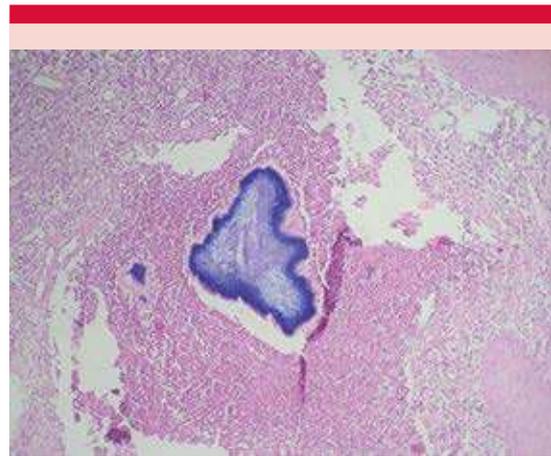


Figura 3. Micetoma humano por *Actinomadura madurae* teñido por la técnica hematoxilina-eosina (H-E) observado a 40x.

Al realizar la técnica de inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario, IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo, observamos algunas células marcadas alrededor de los granos, observándose la mayor cantidad en las células que rodean a los granos por *Actinomadura madurae* y con menor número en los granos por *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis*. **Figuras 4, 5 y 6**

El **Cuadro 1** muestra el análisis semicuantitativo de cada micetoma estudiado.

DISCUSIÓN

El micetoma es un síndrome anatomoclínico, ya que es una micosis granulomatosa de tipo inflamatorio crónico en la dermis superficial, media y profunda en la que se observa un infiltrado moderadamente denso de linfocitos, histiocitos, plasmocitos y focos de polimorfonucleares;^{16,17} estas células, junto con las células dendríticas, tienen un antígeno carbohidrato llamado lactosilceramida (LacCer) o CD17+, que es un buen



Figura 4. Micetoma por *Madurella mycetomatis*. Marcaje de células con anticuerpo monoclonal IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario, IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo, observado a 40x.

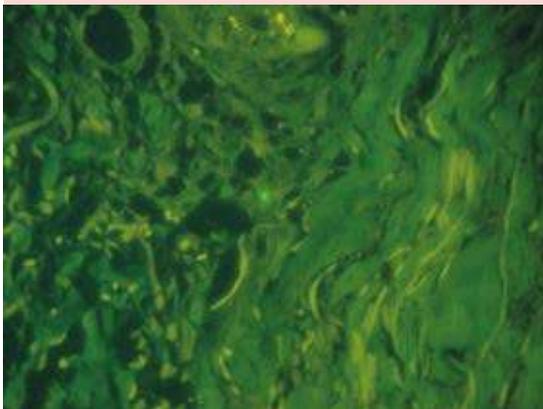


Figura 5. Micetoma por *Nocardia brasiliensis*. Marcaje de células con anticuerpo monoclonal IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario, IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo, observado a 40x.

marcador de granulocitos implicado en la traducción de señales.^{18,19} En los neutrófilos humanos

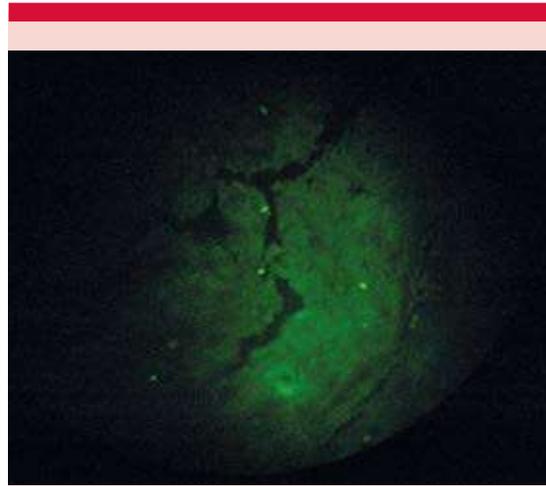


Figura 6. Micetoma por *Actinomyces madurae*. Marcaje de células con anticuerpo monoclonal IgM anti-CD17 humano hecho en ratón y como anticuerpo secundario, IgG anti-IgM de ratón FITC hecho en conejo, observado a 40x.

la unión del anticuerpo anti-LacCer al dominio LacCer causa la producción de superóxido dismutasa y estimula la fagocitosis.²⁰ La lactosilceramida es un glicoesfingolípido que contiene como cabeza polar a una molécula de lactosa unida a un grupo hidroxilo de la ceramida a través de un enlace glicosídico. Este receptor sirve para reconocer (1,3) β -glucanos que son constituyentes estructurales mayoritarios de la pared celular de hongos filamentosos y levaduras, estas estructuras se consideran patrones moleculares asociados con patógenos y, aunque se sabe relativamente poco de la inmunomodulación, esta interacción ha demostrado inducir una variedad de respuestas celulares, como la producción de citocinas incluyendo MIP-2 y TNF, lo que reduce el estallido oxidativo, e induce la activación del NF- κ B aumentando la producción de proteínas inflamatorias en macrófagos del epitelio alveolar.^{13,21,22} La unión de antígenos fúngicos (como los β -glucanos) o bacterianos con este receptor y la unión con el TLR estimulan la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α ,

Cuadro 1. Células CD17+ en cortes de pacientes con micetoma por *Madurella mycetomatis*, *Nocardia brasiliensis* y *Actinoadura madurae*

Micetoma por:	Células CD17+
<i>Madurella mycetomatis</i>	
Muestra 1	++
<i>Nocardia brasiliensis</i>	
Muestra 2	++
Muestra 3	++
Muestra 4	++
Muestra 5	++
Muestra 6	++
Muestra 7	++
<i>Actinoadura madurae</i>	
Muestra 8	+++
Muestra 9	+++

Ausencia de marca: no se manifiestan células con el receptor CD17.

Se contabilizó por milímetro cuadrado el número de células CD17+ localizadas alrededor del grano y se determinó como leve (+) de una a dos células, moderado (++) de tres a cuatro células, o intenso (+++) de cinco en adelante.

IL-1, IL-6, IL-8, INF-gama, IL-12 e IL-18 en la región,^{10,23} aumentando las funciones antimicrobianas de los leucocitos. La lactosilceramida puede ser un factor de adhesión para patógenos, como *Candida albicans*. De hecho, la lactosilceramida puede desempeñar un papel importante en la respuesta innata a estos patógenos.

Entre los receptores implicados en el reconocimiento de β -glucanos se encuentran la lactosilceramida, receptores del complemento (CR) 3, receptores *scavengers* y dectina-1. Se piensa que el reconocimiento celular pueda estar mediado por una combinación de éstos, pero se ha demostrado que dectina-1 es el receptor principal para β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6)-glucanos solubles y particuladas en leucocitos y macrófagos.¹²

La presencia y estimulación de las células CD17+, aunque es muy moderada en los mi-

cetomas, se observa en mayor cantidad en el micetoma producido por *Actinoadura madurae* (cinco o más células CD17+ por campo), seguido por el de *Nocardia brasiliensis* y *Madurella mycetomatis* (entre 3 y 4 células CD17+ por campo), y es posible que funcionen como células accesorias de la inmunidad innata ayudando a otras células, como los queratinocitos en la producción de citocinas proinflamatorias en la lesión, al estimular la fagocitosis y endocitosis en macrófagos y neutrófilos.²⁴

CONCLUSIONES

Se encontraron células CD17+ en todos los micetomas estudiados, que pueden participar activamente en la respuesta inflamatoria de este síndrome.

REFERENCIAS

1. Nenoff P, Van de Sande WW, Fahal AH, Reinell D, et al. Eumycetoma and actinomycetoma. An update on causative agents, epidemiology, pathogenesis, diagnostics and therapy. *J Eur Acad Dermatol* 2015; 29: 1873-1883. doi. 10.1111/jdv.13008.
2. Santana TT, Morales SN, Olazábal RD, Del Águila GA. Micetoma. reporte de un caso. *Arch Méd de Camagüey* 2007; 11 (6): 1-9.
3. Cruz CO, Vega SD, Ramírez HL, Arenas GR. Micetoma. Informe de 174 casos estudiados en 30 años en el Hospital General Dr. Manuel Gea González de la Ciudad de México (1987-2017). *Dermatol Cosmét Méd Quir* 2018; 16 (4): 263-267.
4. López MR, Méndez TL, Bonifaz A, Arenas GR, et al. Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos. *Gac Med Mex* 2013; 149: 586-592.
5. Arastehfar A, Lim W, Daneshnia F, van de Sande WWJ, et al. *Madurella* en tiempo real PCR, un enfoque novedoso para el diagnóstico de eumycetoma. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14 (1): e0007845. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007845>.
6. Serrano JA, Sandoval AH. El micetoma. Revisión. *Rev Soc Ven Microbiol* 2003; 23 (1): 70-79.
7. Brown G, Gordon S. Immune recognition of fungal beta-glucans. *Cell Microbiol* 2005; 7 (4): 471-9. doi. 10.1111/j.1462-5822.2005.00505.x.
8. Brown GD, Williams DL. (1,3)- β -Glucans in Innate Immunity. *Mammalian Systems* 2009; 58: 309-350. doi. 10.1016/B978-0-12-373971-1.00018-2.

9. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-44. doi. 10.1056/NEJM200008033430506.
10. Brown G, Gordon S. Fungal beta-glucans and mammalian Immunity. *Immunity* 2003; 19 (3): 311-315. doi. 10.1016/s1074-7613(03)00233-4.
11. Hahn P, Evans S, Kottom T, Standing J, et al. Pneumocystis carinii cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 2003; 278: 2043-50. doi. 10.1074/jbc.M209715200.
12. Pardo RZ, Perdomo MR. β -(1 \rightarrow 3)-glucans as immunomodulating moléculas polluting pharmaceuticals. *Rev Cub Farm* 2012; 46 (1): 105-116.
13. Evans SE, Hahn PY, McCann F, Kottom TJ, et al. *Pneumocystis* cell wall β -glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor- κ B-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32 (6): 490-497. doi. 10.1165/rmb.2004-0300OC.
14. Ham WA, Cormack HD. Tratado de Histología. 9ª ed. México. Interamericana, 2017; 1-28.
15. Palma RA, Castrillón RL, Pizaña CA, Vega ME, et al. Subpopulations of T lymphocytes in the mycetoma. *Dermatol Rev Mex* 2007; 51 (6): 212-218.
16. Fuentes A, Arenas R, Reyes M, Fernández R, et al. Actinomicetoma por *Nocardia* sp. Informe de cinco casos tratados con imipenem solo o combinado con amikacina. *Gac Méd Méx* 2006; 142 (3): 247-252.
17. Rodríguez AM, Sánchez D, Paulino R, Padilla MC, et al. Micetoma podal por *Nocardia brasiliensis*. Reporte de un caso. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2004; 13 (1): 37-40.
18. Pinargota VM. CD o cluster of differentiation. Universidad Técnica de Manabí 2017; 1-5.
19. Kazuhisa I. Lactosylceramide-enriched lipid raft-mediated infection immunity. *Med Mycol J* 2018; 59 (3): 151-161. doi. 10.3314/mmj.18.008.
20. Shima S, Kawamura N, Ishikawa T, Masuda H, et al. Anticuerpos anti-glicolípidos neutros en la encefalomielleradiculoneuropatía. *Neurol* 2014; 82: 114-118.
21. Mishra S, Chatterjee S. La lactosilceramida promueve la hipertrofia a través de la generación ROS y la activación de ERK1-2 en cardiomiocitos. *Glycob Oxford J* 2014; 24 (6): 518-531.
22. Pannu R, Won JS, Khan M, Singh AK, et al. A novel role of lactosylceramide in the regulation of lipopolysaccharide/interferon- γ -mediated inducible nitric oxide synthase gene expression: implications for neuroinflammatory diseases. *J Neurosci* 2004; 24 (26): 5942-5954. doi. 10.1523/JNEUROSCI.1271-04.2004.
23. González ÁR, Zamora RZ, Alonso Y. Citocinas inflamatorias, sus acciones y efectos en la sepsis y el choque séptico. *Rev Cub Invest Bioméd* 2007; 26 (4): 1-10.
24. Palma RA, Castrillón RL, Encinas PG, Padilla DC, et al. Participación de los queratinocitos en la respuesta inmunitaria contra actinomicetoma. *Dermatol Rev Mex* 2009; 53 (5): 225-33.

AVISO IMPORTANTE

Ahora puede descargar la aplicación de **Dermatología Revista Mexicana**.

Para consultar el texto completo de los artículos deberá registrarse una sola vez con su correo electrónico, crear una contraseña, indicar su nombre completo y especialidad. Esta información es indispensable para saber qué consulta y cuáles son sus intereses y poder en el futuro inmediato satisfacer sus necesidades de información.

La aplicación está disponible para Android o iPhone.

